

andererseits der β - und γ -Bereich als verhältnismäßig quantitativ gering aufzeigen. Nähere Aussagen ohne Absorption bzw. Identitätsreaktionen mit isolierten Komponenten wären hier spekulativ. Es müßten sich biochemische bzw. organ-

analytische Untersuchungen anschließen um die genauere Aufklärung eines Milzextraktes zu ermöglichen und um die Frage zu klären, inwieweit spezifische Identitätsreaktionen zwischen Serumeiweißkörpern und Organeiweißkörpern vorliegen.

Literatur

1. GÖTZ, H. und F. SCHEIFFARTH, Klin. Wschr. 41, 587 (1963). —
2. GÖTZ, H., F. SCHEIFFARTH und I. DÜBELER, Gastroenterologia, Basel 98, 30 (1962). — 3. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und G. SCHERNTHANER, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 6, 481 (1961). —
4. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und G. THUMA, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 7, 355 (1962). — 5. GÖTZ, H., G. BERG und F. SCHEIFFARTH, Zschr. Immunit.forsch., Jena 114, 72 (1962). —
6. GRABAR, P., Bull. Soc. Chim. biol. 36, 65 (1954); Dtsch. med. Wschr. 79, 1916 (1954); Zbl. Bakteriologie 164, 15 (1955). — 7. GRABAR, P. und P. BURTIN, Analyse immuno-électrophorétique. Application avec liquides biologiques humains. Masson & Cie., Paris (1960). — 8. GRABAR, P. und C. A. WILLIAMS, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 10, 193 (1953); 17, 67 (1955). —
9. SCHEIDEGGER, J. J., Internat. Arch. Allergy 7, 103 (1955). —
10. WILLIAMS, C. A. und P. GRABAR, J. Immunol., Baltimore 74, 158 (1955). — 11. URIEL, J. und P. GRABAR, Ann. Inst. Pasteur, Paris 90, 429 (1956). — 12. URIEL, J. und J. J. SCHEIDEGGER, Bull. Soc. Chim. biol. 37, 165 (1955). — 13. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und H. KNOPFF, Acta haemat. 26, 169 (1961). — 14. URIEL, J., P. GRABAR und CH. WUNDERLY, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 2, 35 (1957). — 15. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und F. CZAGANY, Med. Welt 28, 1449 (1961). — 16. URIEL, J., Bull. Soc. Chim. biol. 39, Suppl. I, 105 (1957); Clin. chim. Acta (Amsterdam) 3, 17 (1958); 3, 384 (1958). — 17. SCHEIFFARTH, F., H. WARNATZ und H. GÖTZ, Med. Welt 43, 2216 (1961). — 18. HEINKEL, K., in: N. HENNING, Klinische Laboratoriumsdiagnostik, 2. Aufl., S. 431ff., Urban & Schwarzenberg, München-Berlin (1960). — 19. SCHEIFFARTH, F. und H. GÖTZ, Klin. Wschr. 42, 130 (1964).

Professor Dr. F. Scheiffarth
Medizinische Universitätsklinik
852 Erlangen, Krankenhausstr. 12

Zur Bestimmung des Pregnandiols im Harn nach KLOPPER, MICHIE und BROWN¹⁾

Von

G. E. HALDER

*Aus dem Laboratorium der Frauenklinik des Städt. Krankenhauses im Friedrichshain
(Seiner Zeit Dirig. Arzt: Prof. Dr. Dr. W. Pschyrembel)*

(Der Schriftleitung zugegangen am 12. November 1963)

In Anbetracht der weiten Verbreitung, die die KLOPPERSche Methode zur quantitativen Bestimmung des Pregnandiols im Harn gefunden hat, wird über eigene Erfahrungen bei der routinemäßigen Durchführung dieser Bestimmungen berichtet. Neben einigen Modifikationen wird insbesondere die Anwendung der ALLENSchen Korrektur bei der Messung der Pregnandiol-Farblösungen empfohlen. An 66 Harnen wurde sowohl die monochromatische Messung bei 430 m μ wie die ALLENSche Korrektur bei 380, 420 und 460 m μ durchgeführt. Hierbei werden gegenüber der Originalmethode im Mittel um 28% niedrigere Pregnandiol-Ausscheidungen gemessen. Eine Abkürzung der 17-stdg. Entwicklung des Pregnandiol-Farbkompleses ist nicht möglich.

In view of the widespread use of KLOPPER's quantitativ determination of pregnandiol in urine, results from the routine use of the method in this laboratory are reported. Some modifications and especially the use of ALLEN's correction in measuring the pregnandiol colour are recommended. Both monochromatic measurements at 430 m μ and ALLEN's correction at 380, 420 and 460 m μ were performed on 66 urines. The measured pregnandiol excretions were on an average 28% lower than shown by the original method. The 17 hours development time of the pregnandiol-colour complex could not be shortened.

Die von KLOPPER, MICHIE und BROWN (1) im Jahre 1955 publizierte Methode zur quantitativen Bestimmung des Pregnandiols im Urin erwies sich als das

z. Z. genaueste und empfindlichste Verfahren. Sie löste ältere Methoden, insbesondere die von VENNING angegebene ab (2, 3). Mit diesen Verfahren war eine Erfassung geringer Pregnandiolgehalte nur möglich, gesammelt und aufgearbeitet wurden (4, 5). Die von

¹⁾ Diese Arbeit wurde in den Jahren 1960/61 durchgeführt.

wenn große Harnmengen, d. h. mehrere Tagesharn WESTPHAL (6) eingeführte Fällung des Pregnandiols als Bariumsalz erhöhte zwar die Empfindlichkeit des Nachweises sehr, konnte die Spezifität jedoch nicht wesentlich steigern. Die Erfassung z. B. der in der Proliferationsphase des Zyklus ausgeschiedenen Pregnandiolmengen war mit diesen Fällungsmethoden nicht möglich. Auch die von ASTWOOD und JONES (7) publizierte Modifikation, Fällung des durch Hydrolyse aus dem Glucuronidkomplex freigesetzten Pregnandiols mit Äthanol, änderte diesen Tatbestand nicht. Erst die von TALBOT (8) eingeführte kolorimetrische Messung der Gelbfärbung des Pregnandiols, die bei Umsetzung mit konz. Schwefelsäure auftritt, legte die Grundlage zu empfindlicheren Nachweismethoden. SOMMERVILLE, GOUGH und MARRIAN (9) konnten Genauigkeit und Reproduzierbarkeit so weit erhöhen, daß trotz der Unzulänglichkeiten, auf die besonders SMITH hinwies (10), dieses kolorimetrische Verfahren bis zum Jahre 1955 das zuverlässigste und genaueste darstellte. Die weite Verbreitung, die die dann im Jahre 1955 von KLOPPER angegebene Methode inzwischen gefunden hat, veranlaßt uns, hier über unsere Erfahrungen und einige Modifikationen zu berichten. Dabei wird die Originalmethode, an der vor allem die zweimalige chromatographische Reinigung der zur Kolorimetrie kommenden Pregnandiolextrakte neu ist, als bekannt vorausgesetzt.

Versuche

Hydrolyse: Wir setzen grundsätzlich $\frac{1}{10}$ der 24-Stdn.-Harnmenge ein, da dann in jedem Fall kräftige Farblösungen erhalten werden. Nur in Ausnahmefällen liegen die Extinktionen so hoch, daß mit Küvetten geringerer Schichtdicke gearbeitet werden muß (vgl. unten).

Extraktion: Wir extrahieren stets mit vorgewärmter und kochsalzgesättigter Natronlauge. So treten kaum noch störende Emulsionen auf.

Oxydation: Auch die Kaliumpermanganatlösung zur Oxydation wird, in 1n Natronlauge frisch angesetzt, auf dem Wasserbade vorgewärmt. Dadurch erzielt man eine rasche und vollständige Oxydation. Man schüttelt bis zur vollständigen Entfärbung der KMnO_4 -Lösung und muß auf vollständiges Abfiltrieren des ausfallenden Braunstein-Niederschlags achten. Die KMnO_4 -Qualität ist von untergeordneter Bedeutung, wie ein Versuch, bei dem wir KMnO_4 (Merck) und KMnO_4 (Handelsware) eingesetzt haben, zeigte. Die maximale Differenz, die wir hierbei beobachteten, betrug 3,1% im Endergebnis.

Eine definierte Menge von 5 β -Pregnantriol-(3 α , 17 α , 20 α), die einem Harn zugesetzt wurde, wurde annähernd quantitativ oxydiert und beeinflusste die gefundene Pregnandiolausscheidung nicht. Bei Zusatz von 200 μg 5 β -Pregnantriol-3 α , 17 α , 20 α zu 90 ml Harn betrug der ursprüngliche Pregnandiol-Gehalt des Harns 662 μg , der Mittelwert nach Zusatz des Pregnantriols wurde zu 668 μg gefunden.

I. Chromatographie: Abweichend von der Originalvorschrift bringen wir den Toluolextrakt vollständig zur Trockne (Wasserbad, Stickstoffstrom) und nehmen den Trockenrückstand mit 5 ml Toluol wieder auf. Um sicherzustellen, daß Lösungsmittelreste oder Wasserspuren, die die nachfolgende Chromatographie außerordentlich stören würden, entfernt werden, wird die getrocknete Probe über Nacht im Exsikkator (CaCl_2) aufbewahrt. Der Toluolextrakt kann nach unseren Erfahrungen in verschlossenen Kolben wochenlang aufbewahrt werden, ohne daß Verluste auftreten. Die Einstellung des Aluminiumoxyds auf die geeignete Aktivitätsstufe beobachtet man leicht daran, daß bei Elution mit 0,8%

Äthanol in Benzol alle eluierbaren Chromogene durchlaufen und daß der Durchlauf der Elution mit 3% Äthanol in Benzol farblos ist. Ist die Tropfgeschwindigkeit zu gering, so darf man sie durch Anwendung eines schwachen Druckes (Stickstoff) erhöhen.

Acetylierung: Nach beendeter Umsetzung kann das überschüssige Acetylchlorid durch einfache Destillation aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Das Ausschütteln mit Wasser und Neutralisieren mit Natriumbikarbonatlösung ist dann entbehrlich und damit eine erhebliche Arbeitsersparnis erreicht. Die Prüfung des pH-Wertes der Extrakte zeigte stets eine neutrale Reaktion, so daß auch die laufende pH-Kontrolle entbehrlich ist.

II. Chromatographie: Es ist zweckmäßig, hier mit höhersiedendem Petroläther zu arbeiten, da dann die Gefahr der Bildung von Luftbläschen in der Säule und des Zerreißen der Säule wesentlich eingeschränkt ist. Nach Anfärbung mit Schwefelsäure sind die Eluate meist schon *visuell zu beurteilen*; eine spektrophotometrische Messung aller Eluate wird von uns nur dann durchgeführt, wenn eine neue Aluminiumoxydcharge zur Verwendung kommt. In der Routineanalyse ist sie entbehrlich.

Farbreaktion: Die vor der Anfärbung zuzusetzende Natriumsulfitmenge von 10 mg wird von uns mit einem Kunststoffspatel, der eine kleine Vertiefung trägt, die etwa 10 mg faßt, abgemessen; so spart man das Einwiegen. Eine Versuchsreihe, bei der wir 10 ± 4 mg eingesetzt haben, zeigt, daß die Sulfitmenge *keinen* wesentlichen Einfluß auf die gemessene Extinktion hat. In der Meßreihe der Abbildung 1 wurden 200 μg Pregnandiol ohne vorherige Acetylierung angefärbt. Es wurde einmal Meßprobe und Bezugsprobe mit steigenden Mengen Na_2SO_3 angesetzt (— · — · —), das andere Mal nur in der Meßprobe steigende Na_2SO_3 -Mengen gegen eine konstante Sulfitmenge in der Bezugsprobe angesetzt (— — —).

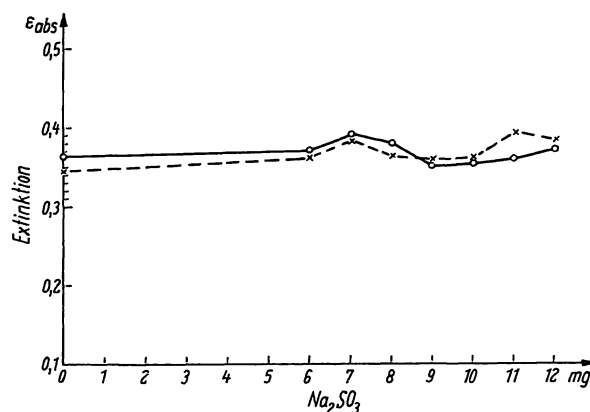


Abb. 1

Einfluß der Na_2SO_3 -Menge auf die Extinktion des Pregnandiol-Farbkomplesse

Bezüglich der *Entwicklung* des Pregnandiol-Schwefelsäurefarbkomplesse versuchten wir, die in der Originalvorschrift geforderte 17-stdg. Entwicklungszeit bei 25° abzukürzen. Wie die Abbildung 2 zeigt, läßt sich auch bei erhöhter Entwicklungstemperatur diese Zeitspanne nicht wesentlich verkürzen. Erst nach 17 Stunden ist die Zunahme der Extinktion mit der Zeit so gering, daß sie für die Dauer der Messung vernachlässigt werden kann (Abb. 2).

Messung: Als Bezugslösung für die Messung lassen wir stets den Acetylchlorid/Benzol-Leeransatz mitlaufen. Nur so wird mit Sicherheit eine evtl. auf die Acetylierung zurückgehende Färbung eliminiert. (In den seltenen Fällen, in denen die Extinktionswerte zu hoch liegen, arbeiten wir mit Küvetten geringerer Schichtdicke. Sehr kleine Extinktionswerte, die die Verwendung von Küvetten größerer Schichtdicke erfordern würden, wurden von uns nie beobachtet.) Der Versuch einer Restfarbestimmung brachte insofern kein Ergebnis, als nach Zerstörung der Pregnandiol-Gelbfärbung mittels H_2O_2 (3-proz.) keine meßbaren Färbungen auftraten. Es ist daher nicht möglich, eine unspezifische Färbung in Abzug zu bringen.

ALLEN-Korrektur: Durch Aufnahme der Absorptionsspektren des authentischen 5β -Pregnandiols-(3α , 20α) und des 5β -Pregnantriols-(3α , 17α , 20α) bestimmten wir die Wellenlängen des Absorptionsmaximums (Abb. 3). Harnextrakte zeigen ein dem kristallinen Steroid ähnliches charakteristisches Spektrum (Abb. 4).

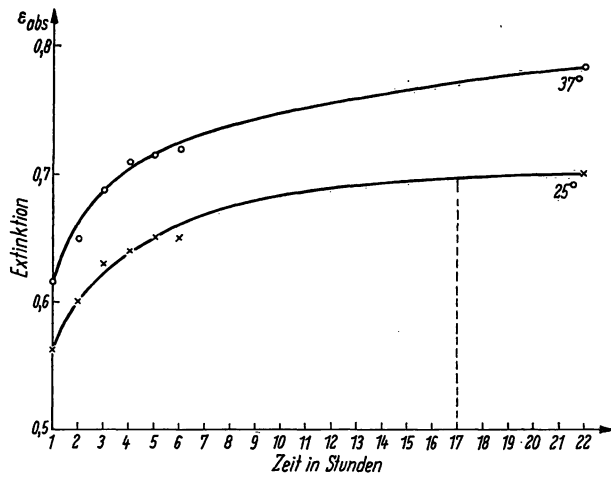


Abb. 2

Abhängigkeit der Extinktion des Pregnandiol-Farbkompleses von Temperatur und Dauer der Farbentwicklung ($\lambda_{\max} = 430 \text{ m}\mu$)

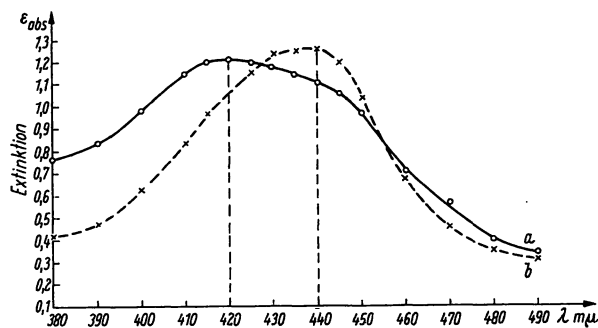


Abb. 3

Absorptionsspektren

- a) des Pregnandiols- 3α , 20α ; $\lambda_{\max.} = 420 \text{ m}\mu$ (500 μg)
 b) des Pregnantriols- 3α , 17α , 20α ; $\lambda_{\max.} = 440 \text{ m}\mu$ (300 μg)
 nach Acetylierung

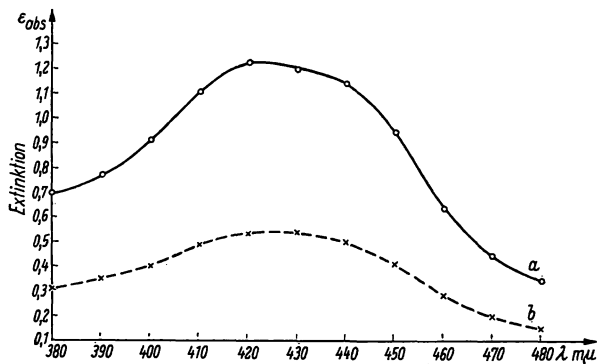


Abb. 4

Absorptionsspektren

- a) eines Gravidenharnextraktes nach Chromatographie [Al_2O_3 (Merck)]
 b) eines Gravidenharnextraktes nach Chromatographie [Al_2O_3 (Woelm)]
 Anfärbung mit H_2SO_4 nach KLOPPER

Tab. 1

Quantitativer Vergleich von 24-Stdn.-Pregnandiol-Ausscheidungs-werten mit und ohne ALLEN-Korrektur

Nr.	E_{430}	E_{korrt}	mg/24 Stdn. ohne Korrt.	mg/24 Stdn. mit Korrt.	Differenz Δmg	Differenz $\Delta \%$
1.	0,910	0,692	4,05	2,65	-1,40	-34,6
2.	0,499	0,238	2,25	1,75	-0,50	-22,2
3.	0,341	0,187	1,60	0,93	-0,67	-41,9
4.	0,430	0,271	2,20	1,65	-0,55	-23,9
5.	0,207	0,103	0,85	0,55	-0,30	-35,3
6.	0,601	0,378	2,35	1,88	-0,47	-20,0
7.	0,326	0,219	1,45	1,15	-0,30	-20,7
8.	0,690	0,505	2,93	2,58	-0,35	-12,0
9.	0,283	0,173	1,30	0,95	-0,35	-26,9
10.	0,174	0,078	0,70	0,35	-0,35	-50,0
11.	0,875	0,655	3,95	3,55	-0,40	-10,1
12.	0,632	0,499	2,80	2,70	-0,10	-3,8
13.	0,242	0,142	1,10	0,73	-0,37	-33,6
14.	2,720	2,310	11,25	11,50	+0,25	+ 2,2
15.	0,483	0,247	2,40	1,33	-1,07	-44,6
16.	0,341	0,173	1,43	0,83	-0,60	-42,0
17.	3,300	2,160	15,25	11,75	-3,50	-23,0
18.	0,999	0,503	4,23	2,45	-1,78	-42,1
19.	0,521	0,244	2,30	1,30	-1,00	-43,5
20.	1,000	0,627	4,50	3,30	-1,20	-26,7
21.	0,799	0,554	3,60	2,95	-0,65	-18,1
22.	0,590	0,254	2,65	1,35	-1,30	-49,1
23.	3,240	5,980	14,50	13,20	-1,30	-9,0
24.	3,960	3,480	17,80	18,40	+0,60	+ 3,4
25.	0,550	0,348	2,50	1,90	-0,60	-24,0
26.	0,472	0,278	2,10	1,50	-0,60	-28,6
27.	0,410	0,213	1,73	1,15	-0,58	-33,5
28.	0,276	0,154	1,32	0,95	-0,37	-28,0
29.	0,545	0,394	2,45	1,95	-0,50	-20,4
30.	1,035	0,692	4,75	3,30	-1,45	-30,5
31.	1,800	1,380	8,00	7,30	-0,70	-8,8
32.	0,850	0,658	3,50	3,17	-0,33	-9,4
33.	0,715	0,455	3,03	2,35	-0,68	-22,4
34.	0,685	0,442	2,80	2,25	-0,55	-19,7
35.	0,271	0,128	1,20	0,65	-0,55	-45,9
36.	0,297	0,151	1,20	0,70	-0,50	-41,7
37.	0,236	0,114	0,95	0,50	-0,45	-47,4
38.	0,359	0,195	1,70	1,08	-0,62	-36,5
39.	0,605	0,403	2,75	2,10	-0,65	-23,7
40.	0,302	0,108	1,33	0,68	-0,65	-48,9
41.	0,688	0,459	3,10	2,45	-0,65	-21,0
42.	0,384	0,198	1,65	1,03	-0,62	-37,6
43.	1,010	0,724	4,80	4,10	-0,70	-14,6
44.	0,545	0,313	2,45	1,70	-0,75	-30,6
45.	0,476	0,231	2,15	1,25	-0,90	-41,9
46.	0,480	0,207	1,85	1,00	-0,85	-43,6
47.	0,415	0,228	1,93	1,23	-0,70	-36,3
48.	0,692	0,351	2,83	1,70	-1,13	-36,4
49.	0,399	0,214	1,73	1,03	-0,70	-40,5
50.	0,335	0,159	1,65	0,98	-0,67	-40,6
51.	0,690	0,379	3,03	2,13	-0,90	-29,7
52.	0,406	0,223	1,85	1,20	-0,65	-35,1
53.	0,620	0,382	2,75	2,05	-0,70	-25,5
54.	0,770	0,541	3,53	2,95	-0,58	-16,5
55.	0,678	0,461	3,05	2,45	-0,60	-19,7
56.	1,300	1,015	5,80	5,35	-0,45	-7,8
57.	0,215	0,151	1,25	0,95	-0,30	-24,0
58.	0,565	0,237	2,55	1,25	-1,30	-51,0
59.	0,250	0,158	1,28	0,98	-0,30	-23,5
60.	0,497	0,289	2,10	1,63	-0,47	-22,4
61.	0,340	0,223	1,65	1,33	-0,32	-19,4
62.	0,424	0,287	1,95	1,50	-0,45	-23,0
63.	0,302	0,181	1,55	1,05	-0,50	-32,3
64.	0,618	0,389	2,75	2,10	-0,65	-23,7
65.	0,663	0,375	2,65	1,85	-0,80	-30,2
66.	0,942	0,640	4,05	3,40	-0,65	-16,1

Dies ermöglicht in Anlehnung an eine Arbeit von LIPP (11) die Anwendung der ALLENSchen Korrekturformel auf den Pregnandiol-Farbkomplex. Die von LIPP angewandte papierchromatographische Auftrennung der Pregnandiol-Eluate, die nach KLOPPER erhalten werden, sowie die erneute Chromatographie der papierchromatographisch erhaltenen Fraktionen erscheinen uns entbehrlich, wenn es sich nicht um extrem niedrige Pregnandiolgehalte handelt. Im Routinebetrieb belastet sie das ohnehin langwierige Analysenverfahren erheblich. Wir glauben, daß die Anwendung der ALLENSchen Korrektur die an sich bereits hochgereinigten Pregnandiolextrakte *spezifisch* zu erfassen gestattet. Gegenüber der von KLOPPER angegebenen einfachen Messung bei 430 m μ werden dann allerdings Werte erhalten, die bis zu 50% unter den nicht korrigierten Werten liegen.

Wir haben in einer Versuchsreihe 66 Pregnandiolextrakte aus Frauenharnen sowohl nach KLOPPER bei 430 m μ als auch bei 380, 420 und 460 m μ spektrophotometrisch gemessen und die auftretenden Differenzen in mg sowie in Prozenten des „KLOPPER-Wertes“ verfolgt. Der arithmetische Mittelwert der absoluten Differenz der Proben beträgt 0,71 mg, die mittlere prozentuale Differenz 28,8% (Tab. 1). Grundlage für die Auswertung war die mit ALLEN-Korrektur am authentischen Pregnandiol aufgenommene, korrigierte Eichkurve (Abb. 5). Der Wert der ALLEN-Korrektur

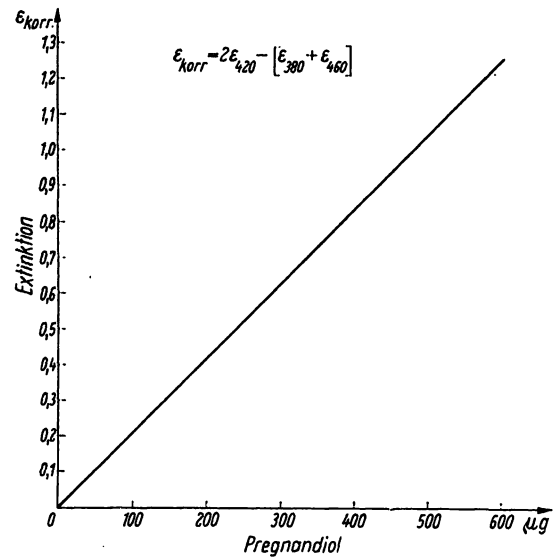


Abb. 5

Eichkurve des acetylierten Pregnandiols-3 α , 20 α nach ALLEN-Korrektur $E_{\text{kor}} = 2E_{420} - (E_{380} + E_{460})$

zeigt sich besonders deutlich an den hohen, „unwahrscheinlichen“ Pregnandiol-Werten, die entweder bestätigt oder als Verunreinigung erkannt werden.

Meinen Mitarbeitern, insbesondere Fräulein MARIANNE FAHLKE, sage ich für ihre unermüdliche und gewissenhafte Mitarbeit meinen Dank.

Literatur

1. KLOPPER, A., E. A. MICHIE und J. B. BROWN, J. Endocr. 12, 209 (1955). — 2. VENNING, E. H., J. biol. Chemistry 119, 473 (1937). — 3. VENNING, E. H., J. biol. Chemistry 126, 595 (1938). — 4. VENNING, E. H. und J. S. L. BROWNE, Endocrinology 27, 707 (1940). — 5. SHINOWARA, G. Y. und H. L. REINHART, Amer. J. Clin. Path. 10, 77 (1940). — 6. WESTPHAL, U., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 281, 14 (1944). — 7. ASTWOOD, E. B. und G. E. S. JONES, J. biol. Chemistry 137, 397 (1941). — 8. TALBOT, N. B., R. A. BERMAN, E. A. McLACHLAN und J. K. WOLFE, J. Clin. Endocr., Springfield 1, 668 (1941). — 9. SOMMERVILLE, I. F., N. GOUGH und G. F. MARRIAN, J. Endocr. 5, 247 (1948). — 10. SMITH, O. W., J. Clin. Endocr., Springfield 10, 496 (1950). — 11. LIPP, G., Acta endocr., K'hn 33, 501 (1960).

Dipl.-Chem. G. E. Halder
1 Berlin 38, Beskidenstr. 37